УДК 612.35+616.36+591.132.5

В. Полетай, асп., А. Жиденко, канд. біол. наук,
С. Весельський, д-р біол. наук, М. Макарчук, д-р біол. наук

ОСОБЛИВОСТІ ПРОМІЖНОГО ОБМІНУ ЖОВЧНИХ КИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА ПРИ ДІЇ ПЕСТИЦИДІВ

Досліджувались зміни в обміні жовчних кислот в організмі коропа лускатого за умов пестицидного навантаження. При дії пестицидів різної хімічної будови спостерігалися зміни вмісту вільних та кон'югованих жовчних кислот в крові, жовчі та тканині печінки коропа, що може свідчити про порушення процесів їх біосинтезу та транспорту через мембрани гепатоцитів.

We stadied a changes of a bile organic contents in the blood, liver and bile of carp in pesticide intoxication. At action of pesticides of a different chemical structure there were the changes in maintenance of free and connected bilious acids in a blood, bile and liver of carp, that can testify the violation of transport processes through the membranes of hepatic cells and changes of their biosynthesis.

Вступ. Фізіологічна роль жовчних кислот в організмі людини і тварин надзвичайно багатогранна. Зокрема, вони приймають активну участь в процесі травлення, проявляючи характерні для їх поверхнево-активні властивості, завдяки чому емульгують ліпіди в кишечнику та одночасно активують ліпазу, а також створюючи міцелярні комплекси сприяють всмоктуванню жирів та жиророзчинних речовин, в тому числі окремих вітамінів [1].

Дифільні властивості жовчних кислот головним чином забезпечують стабільність колоїдної системи жовчі, сприяючи розчиненню в цій біорідині речовин ліпідної природи, зокрема таких важкорозчинних, як холестерин. Окрім того, жовчні кислоти стимулюють роботу гладеньких м'язових клітин, котрі відповідають за перистальтичні скорочення в шлунково-кишковому тракті [2].

Для фізіологічних процесів є важливою взаємодія жовчних кислот із молекулами білків та ліпідів – основними компонентами мембран клітини. Під впливом цих сполук змінюється активність ферментів як на поверхні слизової оболонки, так і в порожнині кишечника. В цілому це веде до змін у процесах мембранного транспорту органічних і неорганічних речовин та перебігу метаболічних процесів в клітинах. Виявлено вплив жовчних кислот на процеси кровотворення, дихання, на функціонування окремих залоз внутрішньої секреції, а також на функціональний стан збудливих структур центральної нервової системи [3].

Слід підкреслити, що як у біосинтезі жовчних кислот, так і у їх подальшій трансформації в гліко-, тауро- та сульфокон'югати задіяна ціла низка поліферментних систем гепатоцитів. Цей ряд перетворень вищезазначених сполук є однією з ключових ланок метаболічного забезпечення зовнішньо секреторної функції печінки.

З іншого боку печінка відіграє провідну роль в детоксикації ксенобіотиків, в тому числі пестицидів, котрі різними шляхами надходять до організму тварин та людини. Ця функція печінки еволюційно удосконалена для перетворення ендогенних токсичних речовин, котрі з'являються в процесі життєдіяльності організму і забезпечується різноманітними ланками обміну речовин в її клітинах. Надходження до організму екзогенних токсичних речовин веде не тільки до переключення вищезазначених природних механізмів детоксикації, а і залучає більш широкий спектр метаболічних процесів в клітинах печінки, котрі лежать в основі забезпечення інших функцій даного органу, зокрема зовнішньосекреторної. В зв'язку з вищезазначеним, є важливим дослідить особливості обміну жовчних кислот в організмі коропа при перебуванні його в середовищі з підвищеною концентрацією пестицидів різної хімічної будови, що в природі може спостерігатися при змиві пестицидів з полів при обробці ними сільськогосподарських культур і їх надходження у водойми через ґрунтові води або при техногенних катастрофах на виробництвах пестицидів та при їх транспортуванні.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження слугував лускатий короп-дворічка (Cyprinus carpio L.) масою 200-250 г. Концентрацію досліджуваних пестицидів (0,08 мг/дм^3 для раундапу (гліфосату) та 0,4 мг/дм^3 зенкора, що дорівнює чотирьом гранично допустимим концентраціям (ГДК) для риб) задавали у 200-літрових акваріумах. Температура води коливалась у межах 8-10^{o}С. Дослід проводився у осінньо-зимовий період впродовж 14 діб. В пробах міхурової жовчі, крові та безпосередньо в тканині печінки риб після екстракції визначали жовчні кислоти за допомогою методу тонкошарової хроматографії, що був розроблений в лабораторії [4]. Тонкошарова хроматографія здійснювалась на хроматографічні пластини Silufol (ЧССР) у системі розчинників: аміловий ефір оцтової кислоти – бутанол – толуол – оцтова кислота – вода у співвідношенні 30:10:10:30:10 за об'ємом. Визначення вмісту окремих вільних та кон'югованих жовчних кислот у вищеназваних біоматеріалах проводили за допомогою денситометра ДО – 1М у відповідності до калібрувальних кривих, побудованих з використанням чистих стандартних речовин. Цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з урахуванням критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між дослідом та контролем при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Жовчні кислоти в організмі тварин та людини зосереджені в системі органів, що забезпечують їх ентерогепатичний колообіг. Печінка відіграє ключову роль як в підтриманні певного рівня даних сполук в цьому процесі, так і у проміжному обміні жовчних кислот у організмі в цілому.

Розподіл жовчних кислот між тканиною печінки та досліджуваними біорідинами в контрольних тварин характеризувався слідуючими співвідношеннями. Так, жовчні кислоти кількісно домінували в міхуровій жовчі і загальна їх концентрація в цій біорідині сягала 6043, 96 ± 415,21 мг%, в той час як в тканині печінки їх рівень сладав лише 34,11 ± 2,96 мг%. Найнижча концентрація даних сполук спостерігалась в крові коропа і становила лише 5,71±0,31 мг% [табл.1]. Слід зазначити, що тонкошарова хроматографія дозволяє у екстрактах досліджуваних тканин та біорідин виявити до дев'яти плям, що утворились в результаті позитивної реакції сполук на фосфорно-молібденову кислоту. Залучення до аналізу окремих стандартів жовчних кислот та активація сірчаною кислотою дали можливість ідентифікувати сім фракцій даних сполук по рухливості на хроматограмі та особливостям флуоресценції в ультрафіолетовому опроміненні. Домінуючими як по кількості, так і по представництву серед виявлених жовчних кислот в досліджуваних біорідинах та тканині печінки коропа виявилися їх похідні, кон'юговані з таурином. Зокрема фракція, яка включала таурохенодезоксихолеву та тауроде-

© Полетай В., Жиденко А., Весельський С., Макарчук М., 2010

зоксихолеву кислоти являють собою головну складову і представлені 91,6% в жовчі, 74,9% в крові та 54,9% в тканині печінки від суми всіх жовчних кислот. Наявність значної кількості дигідроксихоланових кислот в жовчі риб відмічена рядом інших дослідників [5].

Таблиця 1. **Жовчні кислоти в тканинах організму коропів-дворічок при дії пестицидів (мг%, M±m, n=21)**

	Кон'югавані жовчні кислоти				Вільні ЖК		Сума ЖК
	ТХК	ТХДХК+ТДХК	ГХ	ГХДХК+ГДХК	ХК	ХДХК+ДХК	в т.ч. неідент.фр.
	Співвідношення основних фракцій жовчних кислот в контрольній групі тварин						
в крові	0,617±0,102	4,280±0,306	0,057±0,008	0,225±0,017	0,037±0,004	0,077±0,028	5,71±0,31
в печінці	6,451±0,709	19,411±2,014	0,725±0,073	2,375±0,254	0,302±0,031	0,170±0,203	34,11±2,96
в жовчі	247,890±21,367	5536,780±462,347	39,857±2,652	119,217±10,357	24,196±3,421	11,741±0,987	6043,96±415,21
	Зміна кількості жовчних кислот при дії раундапу в дозі 4 ГДК						
в крові	0,385±0,031	2,715±0,254	0,042±0,004	0,066±0,005	0,019±0,002	0,015±0,002	3,47±0,18*
в печінці	10,536±1,623	29,075±3,121	0,695±0,071	2,139±0,226	0,852±0,092	0,918±0,089	51,16±4,32*
в жовчі	68,412±12,367*	3949,781±212,536*	72,445±6,144	214,278±20,369	19,158±1,857	10,230±1,188	4439,9±327,6*
	Зміна кількості жовчних кислот при дії зенкору в дозі 4 ГДК						
в крові	0,573±0,061	4,768±0,49	0,047±0,005	0,034±0,004	0,015±0,002	0,033±0,005	5,810±0,45
в печінці	11,625±1,175	31,698±3,211	1,336±0,102	3,687±0,385	0,848±0,088	0,719±0,097	57,85±4,24*
в жовчі	164,062±15,956*	2695,550±257,328*	42,274±3,547	45,045±4,322	95,787±8,542*	20,025±1,986	3148,08±296,2*

Примітка. * – p<0,05

ЖК – жовчні кислоти; ТХ – таурохолева кислота; ТХДХК – таурохенодезоксихолева кислота; ТДХК – тауродезоксихолева кислота; ГХ – глікохолева кислота; ГХДХК – глікохенодезоксихолева кислота; ГДХК – глікокодезоксихолева кислота; ХК – холева кислота; ДХК – дезоксихолева кислота

Перебування коропа продовж двох тижнів в акваріумі із заданими концентраціями зенкору та раундапу призводило до суттєвих змін у проміжному обміні жовчних кислот. Зокрема, найбільш вагомі зміни у загальній концентрації жовчних кислот зареєстровані в жовчі піддослідних тварин [табл. 1].

Так, при дії раундапу в дозі 4 ГДК у водному середовищі на організм коропа, концентрація жовчних кислот в жовчі піддослідних тварин знизилась на 26,5% ($p < 0,05$). В той час, як зенкор у такій же дозі при даній 14-денній експозиції більш глибоко гальмує біосинтез та транспорт жовчних кислот в каналікулярний простір, про що свідчить зниження їх рівня в міхуровій жовчі на 47,8% ($p < 0,01$) порівняно з контрольними величинами. Останнє в значній мірі було обумовлено зниженням концентрації домінуючих в жовчі коропа тауроконюгованих жовчних кислот при дії раундапу та зенкору, котрі знижувались відповідно на 28,3% ($p < 0,05$) та на 53,4% ($p < 0,01$) порівняно з контрольними тваринами [табл. 1].

Слід відмітити різноспрямований вплив досліджуваних нами пестицидів на рівень вільних жовчних кислот в жовчі риб. Так, якщо раундап одночасно зі зниженням рівня кон'югованих жовчних кислот знижував і рівень вільних жовчних кислот в цій біорідині, то при дії зенкора концентрація вільної холевої кислоти зросла на 383,9% ($P < 0,01$), а рівень суми хено- та дезоксихолевих кислот зріс майже удвічі порівняно з контролем. Це вказує на те, що досліджувані нами речовини по-різному впливають на активність поліферментних систем гепатоцитів, які забезпечують процеси кон'югації жовчних кислот.

Зовсім по-іншому розподіляються досліджувані жовчні кислоти у тканині печінки риб при дії пестицидів. На відміну від виявленого нами зменшення загального вмісту жовчних кислот в жовчі під дією даних речовин, в тканині печінки спостерігалась зворотна реакція, яка супроводжувалась зростанням сумарної концентрації даних метаболітів під дією раундапу на 49,98% ($p < 0,05$) та зенкору на 69,6% ($p < 0,05$) порівняно з контрольними величинами. Однак, в дії цих препаратів на різні ланки жовчно-кислотного обміну виявились певні відмінності. Так, якщо раундап незначно знижував рівень кон'югатів жовчних кислот з гліцином, то зенкор підвищив на 84,3% концентрацію глікохолевої кислоти та глікодіоксихоланових кислот щодо контролю. В той час, на рівень жовчних кислот, кон'югованих з таурином, в цій тканині обидва досліджувані препарати діяли односпрямовано, підвищуючи їх концентрацію в печінці. Концентрації вільних жовчних кислот в цій тканині під дією пестицидів зростали в 3–5 разів порівняно з контрольними величинами. Останнє може вказувати на гальмування процесів, що забезпечують транслокацію як вільних, так і частково кон'югованих жовчних кислот через каналікулярну мембрану гепатоцитів за умов пестицидного навантаження на організм коропів.

Отримані дані по визначенню жовчних кислот в крові коропів вказують на те, що при навантаженні їх організму раундапом, загальна концентрація даних метаболітів знижується на 39,2% ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Це суттєве зниження було обумовлене головним чином змінами рівня тауродиоксихоланових кислот в цій біорідині. Зенкор справив протилежну реакцію в зміні цього показника, так як концентрація суміші таурохено- та тауродезоксихолевої кислоти зросла на 11,4% порівняно з контролем та на 75,4% ($p < 0,05$) була більша відносно величин, отриманих в дослідах при дії раундапу. Виявлене співвідношення в цій біорідині може вказувати на певне гальмування зенкором процесів транслокації даних метаболітів на синусоїдальній мембрані гепатоцитів, забезпечуючих адсорбцію їх з крові тварини.

Аналізуючи в цілому дані по зміні концентрацій вільних та кон'югованих жовчних кислот в досліджуваних біорідинах та тканині печінки при навантаженні організму коропа лускатого у водному середовищі заданими концентраціями пестицидів різної хімічної будови можна констатувати, що зенкор і раундап не однаково впливають на розподіл та співвідношення по тканинах досліджуваних нами метаболітів жовчно-кислотного обміну. Різноспрямований вплив даних пестицидів на перебіг процесів в окремих ланках вуглеводного та ліпідного обміну був виявлений дослідниками раніше [6].

Встановлені зміни у співвідношенні вільних та кон'югованих жовчних кислот в тканині печінки та досліджуваних біорідинах обумовлені відповідними змінами перебігу процесів їх біосинтезу, кон'югації та транслокації через синусоїдальні та каналікулярні мембрани гепатоцитів, що в підсумку суттєво впливає на перебіг проміжного обміну даних метаболітів в організмі риб при дії досліджуваних пестицидів.

1. Саратиков А.С., Скакун Н.П. Желчеобразование и желчегонные средства. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1991. – 260 с. 2. Романенко В.Д. Пе-

чень и регуляция межуточного обмена (млекопитающие и рыбы). – К., "Наук. думка", 1978. – 184 с. 3. Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма. – К.: Наукова думка, 1980 г. – 179с. 4. Способ определения желчных кислот в биологической жидкости: А.с. 4411066/14 СССР, МБИ G 01 N 33/50 / С.П.Весельский, П.С. Лященко, И.А. Лукьяненко (СССР). – №1624322; Заявлено 25.01.1988; Опубл. 30.01.1991, Бюл. №4. 5. Рипатти П.О., Сидоров В.С. Эколого-физиологическая роль желчных кислот у рыб. // Сравнительная биохимия водных животных. – 1983. – С. 17-28. 6. Мехед О.Б., Яковенко Б.В., Жиденко А.О. Вплив зенкору на вміст глюкози та активність ферментів глюконеогенезу в тканинах коропа лускатого (Cyprinus carpio L.) при різних температурах // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №3. – С. 99-103.

Надійшла до редколегії 02.09.09

УДК 577.112.7

А. Кундієва, асп., Д. Мінченко, пров. інж., О. Яворовський, проф., О. Мінченко, проф.

ВПЛИВ МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЕФІРУ НА ЕКСПРЕСІЮ МРНК ПРОТЕЇНКІНАЗИ SNARK, КАЗЕЇНКІНАЗИ-1, CLOCK, BMAL1 ТА PER2 У ЩУРІВ

Протікання як фізіологічних, так і біохімічних процесів у організмі має циркадіальний характер і контролюється генами Per2, BMal та Clock, а також казеїнкінази-1, що контролює їх функціональну активність та приймає участь у регуляції ряду інших надзвичайно важливих процесів, причому порушення механізмів їх регуляції може спричинювати розлади у функціонуванні сигнальних каскадів у клітинах і приводити до виникнення багатьох патологічних процесів. Встановлено, що під впливом метил-третбутилового ефіру, екологічно небезпечної токсичної хімічної сполуки, значно порушується експресія мРНК казеїнкінази-1, Per2, BMal1, Clock та протеїнкінази SNARK у печінці, легенях та міокарді щурів і що може бути причиною розвитку різних патологічних станів, у тому числі і виникнення злоякісних новоутворень. Результати даної роботи переконливо свідчать про виражену дію метил-третбутилового ефіру на важливі ключові механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії циркадіальних генів Per2, BMal1, Clock, SNARK та казеїнкінази-1, що може слугувати важливим чутливим показником шкідливої дії на організм хімічних забруднювачів довкілля. У зв'язку з цим, дослідження експресії циркадіальних генів та генів ряду протеїнкіназ, що контролюють основні метаболічні процеси в організмі, можуть бути чутливими маркерами біонебезпеки.

Both physiological and biochemical processes of an organism proceed in a circadian manner and are controlled by the Per2, BMal, and Cloc k genes, also casein kinase 1ε, which controls their functional activity and takes part in the regulation of several other very important processes. In addition, changes in the mechanisms of their regulation could cause signal cascades in cells to function improperly and could lead to appearance of many pathological processes. It has been shown that exposure to MTBE, an ecologically dangerous and toxic chemical compound, significantly affects the expression of mRNA of casein kinase 1ε, Per1, BMal1, Clock and the protein kinase SNARK in the liver, lungs and myocardium of rats, which could be the cause of the development of different pathologies, including the appearance of malignant tumors. The results of this work convincingly show the affect of metyl tertbutyl ether on important mechanisms of regulation of metabolic processes in the cell by the level of expression of the circadian genes Per2, BMal1, Clock, SNARK and casein kinase 1ε, which can serve as a sensible measurement of the toxic effects biohazard contaminants have on the organism. Accordingly, studies of the expression of circadian genes and the genes of several protein kinases, which control the main metabolic processes of the organism, can be used as sensible markers of affects of biohazard materials.

Вступ. Життєдіяльність організмів, як і протікання фізіологічних та біохімічних процесів у них, має циркадіальний характер і порушення механізмів їх регуляції може спричинювати розлади у функціонуванні сигнальних каскадів у клітинах, що є одною із причин виникнення багатьох патологічних процесів, у тому числі і злоякісного росту. Найбільш важливими генами, що регулюють протікання циркадіальних процесів у нормі та при патологічних станах є гени групи Per та Cry, BMal1 та Clock, а також протеїнкінази та фосфатази, що контролюють їх функціональну активність [1, 2]. Найбільш важливою протеїнкіназою, що контролює експресію та функціональну активність циркадіальних генів є казеїнкіназа-1, причому вона приймає участь у регуляції і ряду інших надзвичайно важливих процесів. Так, було встановлено, що казеїнкіназа-1 зв'язується з Per1, Per2 та Per3 і фосфорилює їх, що істотнім чином змінює функціонування генів, які контролюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, Mdm-2, c-myc і Gadd45alpha) та онкогенів, приймає участь у дестабілізації-катенін-деградуючого комплексу, у функціонуванні TGF-сигнального каскаду, в інактивації білка bid через його розщеплення каспазою 8, фосфорилює p53, білок, що пригнічує ріст пухлин, негативно регулює фосфо-Akt через PTEN [3]. Ряд інших протеїнкіназ та фосфатаз, зокрема SNARK, є не менш важливими регуляторами цих процесів як у нормі, так і при різних патологічних станах [4]. Відомо, що активність протеїнкінази SNARK, що є представником серин/треонінових AMPK кіназ, змінюється клітино-специфічно при різноманітних стресових станах клітин, приймає участь в індукованій CD95 рухливості та інвазивності, а нокаутні по SNARK миші характеризуються ожирінням, відповідними порушенням метаболізму вуглеводів та ліпідів і мають схильність до виникнення злоякісних пухлин подібно до тварин, нокаутних по циркадіальним генам [5]. Відомо, що циркадіальний характер регуляції процесів життєдіяльності обумовлений відповідним коливанням експресії генів циркадіального годинника і є дані про існування популяцій людей з різним типом протікання циркадіальних процесів [1]. Більше того, роботами багатьох дослідників виявлено, що при ряді захворювань мають місце порушення в регуляції експресії циркадіальних генів, які можуть бути причетні також і до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [2, 6, 7]. Останнім часом виявлена залежність експресії ряду циркадіальних генів від гіпоксії, що також значною мірою може приводити до змін у функції цих генів та сприяти прогресії пухлин. Крім того, для циркадіальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції, що надзвичайно важливо для точної і чіткої робити циркадіального годинника [8].

Таким чином, циркадіальні гени та протеїнкінази і фосфатази, зокрема казеїнкіназа-1 та SNSRK, які контролюють експресію та функціональну активність циркадіальних генів та цілий ряд інших надзвичайно важливих процесів є компонентами молекулярного годинника, який контролює циклічний характер протікання як фізіологічних та біохімічних процесів, так і життєдіяльність організму [9]. Ці надзвичайно важливі регуляторні процеси можуть бути досить чутливими до впливу різних токсичних сполук, зокрема до дії метил-третбутилового ефіру, екологічно небезпечної хімічної сполуки, яка широко використовується для збільшення октанового числа бензинів [10].

Метою даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу метил-третбути-

© Кундієва А., Мінченко Д., Яворовський О., Мінченко О., 2010